

Streszczenie

Tropomiozyna (Tpm) jest białkiem wiążącym aktynę, które odgrywa kluczową rolę w regulacji cienkiego filamentu. Tpm układa się wzdłuż filamentu i wiąże siedem kolejnych podjednostek aktyny za pośrednictwem powtarzalnych regionów P1–P7. Wraz z kompleksem troponiny (Tn) Tpm kontroluje, w sposób zależny od Ca^{2+} , interakcje aktyna–miozyna. Ponadto Tpm wpływa na stabilność i obrót cienkich filamentów, które są regulowane przez białka wiążące aktynę, w tym kofilinę (Cof), promującą przecinanie i depolimeryzację filamentów aktynowych, oraz tropomodulinę (Tmod), która czapeczkuje koniec zaostrowy filamentu i ogranicza wymianę podjednostek aktyny. Mutacje zmiany sensu w genach kodujących Tpm są związane z wrodzonymi chorobami mięśni–miopatiami oraz dystalnymi artrogrypozami. Molekularne mechanizmy łączące lokalne zmiany strukturalne w Tpm z zaburzoną regulacją cienkiego filamentu i fenotypami chorobowymi nie są w pełni poznane.

Celem niniejszej rozprawy było określenie, w jaki sposób dwa powtarzalne regiony P1 i P5 w Tpm2.2, które uczestniczą w oddziaływaniach z aktyną i Tn oraz biorą udział w regulacji wiązania miozyny, wpływają na funkcjonalną komunikację między aktyną, miozyną, Tn, Cof i Tmod. Aby osiągnąć ten cel, do badań wybrano cztery związane z chorobami mutacje w *TPM2*, genie kodującym izoformę Tpm2.2 charakterystyczną dla mięśni szkieletowych: podstawienia D20H i E181K, związane z fenotypami hiperkurczliwymi i zlokalizowane odpowiednio w N-końcowych rejonach P1 i P5, oraz E41K i N202K, związane z fenotypami hipokurczliwymi i zlokalizowane w C-końcowych rejonach tych powtórzeń. Cienkie filamenty rekonstruowane z białek rekombinowanych oraz białek izolowanych z mięśni wykorzystano w badaniach *in vitro* do określenia roli regionów P1 i P5 w interakcjach białko–białko, polimeryzacji aktyny, długości i stabilności filamentów oraz w zależnym od Cof2 przecinaniu i depolimeryzacji filamentów.

Żaden z badanych wariantów nie zmieniał istotnie powinowactwa Tpm2.2 ani do F-aktyny, ani do Tn, co wyklucza utratę stabilnego związania z filamentem jako główny mechanizm chorobowy. Jednak warianty hiperkurczliwe zmieniały orientację Tpm2.2 na filamentach aktynowych, co osłabiało hamowanie aktywności ATPazowej aktomiozyny. Natomiast orientacja wariantów hipokurczliwych na filamentach nie ulegała zmianie, a ich wpływ hamujący na aktywność ATPazową był porównywalny z Tpm2.2 typu dzikiego. Fenotypy zależne od mutacji były również widoczne w obecności kompleksu Tn ($\pm\text{Ca}^{2+}$). Warianty hipokurczliwe nie były

zdolne do pełnej aktywacji aktywności ATPazowej, zachowując jednocześnie zdolność do jej hamowania, podczas gdy hiperkurczliwe warianty Tpm2.2 powodowały nadmierną aktywację, ale wykazywały zmniejszone hamowanie aktywności ATPazowej aktomiozyny. Eksperymenty w warunkach pojedynczego obrotu enzymatycznego nie wykazały istotnego wpływu mutacji na wiązanie ATP ani na dysocjację i reasocjację aktomiozyny, natomiast ujawniły przeciwstawne efekty dotyczące uwalniania produktów reakcji. Warianty hiperkurczliwe przyspieszały uwalnianie ADP, podczas gdy warianty hipokurczliwe spowalniały ten etap, dostarczając bezpośredniego kinetycznego wyjaśnienia zmienionej aktywności motorycznej miozyny. W teście ruchliwości *in vitro* warianty hiperkurczliwe zwiększały przemieszczanie filamentów aktynowych napędzane przez miozynę, natomiast warianty hipokurczliwe je zmniejszały, zgodnie z klinicznymi fenotypami hiper- i hipokurczliwości związanymi z tymi mutacjami. Różnice fenotypowe odzwierciedlała także wrażliwość na Ca^{2+} , która wzrastała w obecności wariantów hiperkurczliwych i malała w obecności wariantów hipokurczliwych. Niezależnie od fenotypu, mutacje w P1 wzmacniały bezpośrednią interakcję między Tpm2.2 i Tn pod nieobecności aktyny, podczas gdy mutacje w P5 nie wywoływały takiego efektu. Wyniki te wskazują, że zmiany powinowactwa Tn do Tpm2.2 nie determinowały różnic fenotypowych między badanymi wariantami Tpm2.2.

Mutacje nie wpływały na kinetykę polimeryzacji aktyny ani na długość filamentów w stanie stacjonarnym. Analizy długości filamentów w warunkach obciążenia mechanicznego indukowanego przez miozynę generowanego przez ATP-zależne interakcje aktomiozyny, wykazały, że mutacje wpływały na stabilność filamentów w sposób zależny od kontekstu. Obecność Tn silnie chroniła filamente przed zależnym od Cof2 przecinaniem i depolimeryzacją. Również w tym przypadku, efekty mutacji zależały od ich położenia w Tpm2.2 oraz od obecności Tmod1. Ponieważ mutacje nie zmieniały powinowactwa ani Cof2, ani Tmod1 do aktyny, obserwowane efekty dotyczące długości i stabilności filamentów prawdopodobnie wynikały ze współdziałania wielu czynników.

Podsumowując, podstawową funkcją wiążących aktynę powtórzeń P1 i P5 jest regulacja skurczu poprzez kontrolę oddziaływań aktyna-miozyna. Efekty patogennych mutacji w obrębie tych powtórzeń ściśle korelują z obserwowanymi u pacjentów fenotypami hiper- i hipokurczliwości. Ponadto, mutacje destabilizują filamente i zmieniają ich długość, przez co mogą

przyczyniać się do dezorganizacji cienkich filamentów oraz powstawania nieprawidłowych struktur obserwowanych w komórkach mięśniowych pacjentów.